

PCT/EP 99/09633  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

ESU

EPO - Munich  
38  
05. Feb. 2000

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1299/9633

**Bescheinigung**

Die AESCULAP AG & Co KG in Tuttlingen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren  
porösen Vlieses, Verfahren zu ihrer Herstellung und  
Verwendung"

REC'D 21 FEB 2000
WIPO PCT

am 9. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
A 61 K 9/26 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 12. Januar 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Markenzeichen: 198 56 668.9

Brand



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PATENTANWÄLTE  
RUFF, BEIER UND PARTNER  
STUTTGART

Dipl.-Chemiker Michael Ruff  
Dipl.-Ing. Joachim Beier  
Dipl.-Phys. Jürgen Schöndorf  
Dipl.-Chem. Dr. Thomas Mütschele  
European Patent Attorneys  
European Trade Mark Attorneys

Willy-Brandt-Straße 28  
D-70773 Stuttgart  
Telefon (0711) 22 2976-0  
Telefax (0711) 22 2976-76  
Country/Area Code: +49-711

Dresdner Bank (BLZ 600 800 00) Kto. 9011341  
Landesgrasse (BLZ 600 501 01) Kto. 2 530 413  
Postbank Stuttgart (BLZ 600 100 70) Kto. 429 30-708  
VAT-Nr.: DE 147528073

Ruff, Beier und Partner · Willy-Brandt-Straße 28 · D-70773 Stuttgart

Anmelder: AESCULAP AG & CO. KG  
Am Aesculap-Platz  
D-78532 Tuttlingen

A 32 508

8. Dezember 1998 R/19

Beschreibung

Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren porösen Vlieses, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft eine Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren porösen Vlieses aus Kollagenfibrillen in lyophilisierter Form, ein Verfahren zur Herstellung der Wirkstoffmatrix und ihre Verwendung.

Der Bedarf an resorbierbaren Hämostypika hat in den vergangenen Jahren zur Entwicklung einer Reihe von Produkten auf Kollagenbasis geführt. Kollagenschwämme werden seit vielen Jahren in großem Umfang klinisch eingesetzt. Als Beispiel für den chirurgischen Einsatz seien genannt:

- Kapillare Blutungen
- parenchymatöse Hämorrhagien
- unterstützende Maßnahmen für andere hämostypische Techniken.

Kollagenschwämme in Kombination mit den kommerziell erhältlichen Fibrinklebesystemen werden zur Stillung diffuser Blutun-

A 3 - 2 -

gen, vor allem im Bereich der parenchymatösen Organe, verwendet.

Seit einigen Jahren liegen Produkte im Handel vor, die aus Kollagen beladen mit Aminoglycosiden bestehen. Bei diesen Produkten handelt es sich um gefriergetrocknete Lösungen aus gelöstem Kollagen und Gentamicinsulfat. Der Nachteil dieser gefriergetrockneten antibiotikahaltigen Kollagenschwämme besteht darin, daß nach Implantation die Wirkung des Wirkstoffes schnell nachläßt.

In der Patentschrift DE 32 12 412 C2 wird eine gewebeverklebbare kollagene Wundauflage beschrieben. Isolierte Rindersehnen werden homogenisiert und anschließend in zitronensauren Lösung bzw. essigsaurer Pepsinlösung das lösliche Kollagen extrahiert. Das so extrahierte, gelöste Kollagen wird nach Dialyse mit entsprechenden Wirkstoffen wie Antifibrinolytika bzw. wasserlöslichen Antibiotika versetzt und gefriergetrocknet.

Die Offenlegungsschrift DE 31 24 981 A1 beschreibt eine wirkstoffhaltige Kollageneinlage zum Einführen in Knochen oder Weichteile. Auch hier wird das Kollagen als zitronensauren Extrakt aus Rindersehnern gewonnen und dieser Extrakt mit dem Wirkstoff versehen. Der Extrakt, bestehend aus gelöstem Kollagen und gelöstem Antibiotikum wird lyophilisiert. Wird diese Kollageneinlage zum Beispiel in die Tibia eingeführt, so wird sie dort innerhalb von 3 Wochen vollständig resorbiert, wobei während dieser Zeit Antibiotikum freigegeben wird.

In der europäischen Patentschrift EP 0 360 180 B1 wird ein Verfahren zur Herstellung von Kollagenschwämmen in Form endloser Bänder beschrieben. Auch hier wird das Kollagen in Lösung gebracht, in dem ein definierter Teil der intermolekularen Bindungen gespalten wird. Diese Spaltung wird so geführt, daß

ein Großteil des Kollagens wasserlöslich gemacht wird. Die intramolekularen Bindungen des Kollagens werden nicht angegriffen. Die Spaltung kann aber auch so gesteuert werden, daß nur eine geringe Anzahl intermolekularer Bindungen gespalten wird, so daß überwiegend höhermolekulare, wasserunlösliche Kollagenaggregate erhalten werden, die in Wasser dispergiert sind. Mit welchen Hilfsmitteln die kontrollierte intermolekulare Spaltung durchgeführt wird, ist nicht beschrieben.

Weitere Verfahren zur Herstellung von Kollagenschwämmen durch Gefrier Trocknung von Kollagenlösungen oder -dispersionen sind seit langem bekannt (z.B. EP 0 209 726, Beutler/Eblinger/Lindner; DE-OS 32 03 957, Eckmayer; US-PS 3 157 524, Artandi; DE-OS 33 15 678, Ciocca und DE 18 11 290, Chvapil).

Es besteht der Wunsch, eine Wirkstoffmatrix zu schaffen, bei der die Wirkung des Wirkstoffes über längere Zeit anhält. Weiterhin soll die Wirkstoffmatrix in einfacher Weise herstellbar sein, biologisch verträglich sein und Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen unterschiedlicher Art aufnehmen können.

Gegenstand der Erfindung ist eine Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren porösen Vlieses aus Kollagenfibrillen in lyophilisierter Form mit einer lang andauernden Freigabe von Wirkstoffen, enthaltend mindestens einen in Wasser und Körperflüssigkeiten schwerlöslichen Wirkstoff in homogener Verteilung.

Die erfindungsgemäße Wirkstoffmatrix, die als wirkstoffhaltiges Kollagen implantatgeeignet ist, erfüllt folgende Anforderungen:

Die Wirkstoff- bzw. Trägermatrix ist sterilisierbar, resorbierbar, zeigt keine bleibende Gewebereaktion,

bringende Störung der Wundheilung, ist leicht applizierbar und bietet einen großflächigen Gewebekontakt.

Die Wirkstoff-Freisetzung ist protrahiert, sie ist vollständig. Es lassen sich hohe lokale Gewebespiegel erreichen, verbunden mit einer geringen systemischen Konzentration.

Durch die Erfindung wird weiterhin ein Verfahren geschaffen, das die Einarbeitung von in Wasser schwerlöslichen Wirkstoffformen, insbesondere Arzneiformen, in eine Kollagensuspension ermöglicht. Die Einarbeitung erfolgt in der Weise, daß die Homogenität der Wirkstoffverteilung gewährleistet ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer biologisch abbaubaren Wirkstoffmatrix in Form eines offenporigen Vlieses aus unvernetzten resorbierbaren Kollagenfibrillen, insbesondere bovinen Ursprungs, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man gereinigte, entfettete und getrocknete Hautstücke in verdünnten organischen Säuren quellen läßt, bis ein elastisches Material entsteht, die gequollenen Stücke unter Vergrößerung des pH-Wertes mehrfach mit wässrigen Medien spült, die gequollenen Stücke zur Bildung einer Suspension von Kollagenfibrillen mechanisch zerfasert, die einen pH-Wert von  $> 3,5$  bis  $< 4,8$  aufweisende gleißfähige Kollagensuspension mit mindestens einem schwerlöslichen Wirkstoff in fein verteilter Form versetzt und homogenisiert und die wirkstoffhaltige Suspension anschließend zu dem Vlies lyophilisiert.

Als Ausgangsmaterial für die Wirkstoffmatrix dient vorzugsweise Rinderhaut. Zur Erzielung der quellbaren Stücke wird die Haut vorzugsweise nach Äscherung und Entfernung der Epidermis und Subcutis zu würfelförmigen Stücken zerkleinert. Diese können dann anschließend gereinigt, entfettet und ge-

trocknet werden, so daß sie in einer für die Anwendung geeigneten Form vorliegen.

Die erfindungsgemäß Wirkstoffmatrix liegt in Vorteil mit einer Schichtdicke von 0,5 mm bis 15 mm, insbesondere 2 mm bis 5 mm, vor. Im unteren dünnen Bereich kann man von einem Vlies sprechen. Im oberen dicken Bereich kommt die Struktur der Wirkstoffmatrix einem Schwamm nahe und kann als solcher bezeichnet werden. Die Dichte des Vlieses liegt in der Regel zwischen 12 mg/cm<sup>3</sup> und 180 mg/cm<sup>3</sup>, insbesondere 40 mg/cm<sup>3</sup> und 80 mg/cm<sup>3</sup>. Je höher die Dichte ist, desto größer ist die Resorptionszeit, was auch einen Einfluß auf die Dauer der Wirkstoffabgabe hat.

Aufgrund seiner Herstellung durch Lyophilisation kann das Porenvolumen der erfindungsgemäßen Wirkstoffmatrix sehr hoch gehalten werden. In der Regel liegt es bei 60 bis 80 % des Gesamtvolumens. Die mittlere Porengröße liegt etwa im Bereich von 20 bis 150 µm. Die spezifische Oberfläche, gemessen nach Brunauer, Emmett und Teller (BET) liegt in der Regel bei 150 bis 350 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> Kollagenvlies. Dies bedingt auch eine hohe bevorzugte Luftdurchlässigkeit von 2.500 bis 5.000 ml/cm<sup>2</sup>/min, insbesondere 2.700 bis 3.400 ml/cm<sup>2</sup>/min, bei einer Schichtdicke von 4,2 mm.

Als in Körperflüssigkeiten schwerlösliche Wirkstoffe gelten solche, die im physiologischen Milieu eine Löslichkeit von kleiner 10 mg/ml besitzen, besonders wichtig und vorteilhaft sind diejenigen Wirkstoffe, die eine Löslichkeit von gleich oder kleiner 1 mg/ml haben. Wirkstoffe können sowohl Arzneimittelfunktion haben, was in der Regel der Fall ist. Es können aber auch andere Substanzen als Wirkstoffe eingesetzt werden, wie beispielsweise Diagnostika, bei denen es genauso wichtig sein kann, daß sie über einen größeren Zeitraum langsam freigesetzt werden.

Als geeignete Arzneimittel seien hier genannt:

Aus der Klasse der Steroid-Antibiotika: Fusidinsäure.  
 Aus der Klasse der Sulfonamide: Silber-Sulfadiazin  
 Makrolid-Antibiotika: Erythromycin, Rifampicin.  
 Aus der Klasse der Aminoglycosid-Antibiotika: Clindamycin-Palmitat, Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid (Sobelin®), Fa. Pharmacia et Upjohn) sowie Gentamycin-Crocefat (E. Merck, Darmstadt, EMD 46/217, EP 0 173 186 A1, Beispiel 9).  
 Aus der Klasse der Glycopeptide: Vancomycin.  
 Aus der Klasse der Chinolone: Nalidixinsäure, Ciprofloxacin.

Der Gehalt an Wirkstoff in der Wirkstoffmatrix kann in weite Grenzen variieren. In der Regel liegt er zwischen 3 und 30 Gew.%, bezogen auf das Gesamtgewicht der lyophilisierten Wirkstoffmatrix, insbesondere zwischen 5 und 20 Gew.%. Das Flächengewicht der Wirkstoffmatrix kann je nach Schichtdicke in weiten Grenzen variieren. In der Regel liegt es zwischen 1 und 50 mg/cm<sup>2</sup>, insbesondere zwischen 10 und 20 mg/cm<sup>2</sup>.

Unter den Arzneimitteln mit antibiotischen Eigenschaften sind die Aminoglycosid-Antibiotika Clindamycin-Palmitat bzw. Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid sowie Gentamycin-Crocefat besonders bevorzugt. Die erfindungsgemäße Wirkstoffmatrix kann auch mehrere schwerlösliche Wirkstoffe, insbesondere mit unterschiedlicher Wirkungsrichtung, enthalten. In ähnlicher Weise ist auch möglich, neben dem mindestens einen schwerlöslichen Wirkstoff einen oder mehrere Wirkstoffe mit weniger schwerer Löslichkeit oder leichter Löslichkeit in der Wirkstoffmatrix vorzusehen. Auch hier ist es möglich, Wirkstoffe mit unterschiedlicher Wirkungsrichtung vorzusehen. In der Regel ist es bevorzugt, Wirkstoffe mit gleicher Wirkungsrichtung aber unterschiedlich schneller Freigabe vorzusehen. So kann beispielsweise bei den Antibiotika ein Antibiotikum mit retardierter Freigabe wie Gentamycin-Crocefat kombiniert sein mit einem Antibiotikum gleicher Richtungswirkung mit schnell-

ler Freigabe, wie Gentamycin-Sulfat. Dadurch ist es möglich, erwünschte anfängliche hohe Gewebespiegel an Antibiotikum zu erzielen, verbunden mit einer lang andauernden retardierten Freigabe des schwerlöslichen Antibiotikums. Die erfindungsgemäße Wirkstoffmatrix eignet sich deshalb in hervorragender Weise zur Verwendung als implantierbares und resorbierbares Depot für Wirkstoffe mit retardierter Wirkstoffabgabe, ggf. in Zusammenhang mit Wirkstoffen mit rascher Wirkstoffabgabe.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Wirkstoffmatrix wurde gefunden, daß sich die Handhabung der Suspension von Kollagenfibrillen, die in der Suspension in weitgehend isolierter Form vorliegen, wesentlich vereinfachen läßt, wenn die Suspension einen pH-Wert von  $> 3,5$  bis  $< 4,8$  besitzt. In diesem pH-Bereich ist die Kollagensuspension gleichmäßig und erwidrigt es, die Wirkstoffe nach ihrer Zugabe in homogener Weise in das Suspension zu verteilen, so daß sie in der fertigen Matrix ebenfalls in homogener Form, eingebettet zwischen die Kollagenfibrillen, vorliegen. Es ist grundsätzlich möglich, den geeigneten pH-Wert nach der mechanischen Zerkleinerung der Kollagenstruktur durch Zugabe von Säure oder Base einzustellen. Mit großem Vorteil für Verfahren und Produkt verbunden ist jedoch eine bevorzugte Arbeitsweise, bei der die Säurekonzentration bereits beim Quellvorgang so eingestellt wird, daß nach dem Spülen der gequollenen Kollagenstücke und beim anschließenden Zerkleinern der Stücke in die Kollagenfibrillen eine Suspension erhalten wird, bei der sich dieser pH-Bereich von selbst ergibt. Ein pH-Bereich zwischen 4,0 und 4,5 ist bevorzugt. Da der pH-Bereich durch Wahl der Konzentration der organischen Säure in Kombination mit der Anzahl der Spülungen und ggf. der Menge der Spülflüssigkeit, einstellbar ist, bestehen hier genügend Variationsmöglichkeiten, um das gewünschte Ergebnis zu erhalten. Normalerweise werden mindestens zwei Spülungen vorgenommen, insbesondere mindestens fünf Spülungen. Bei einem Spülzyklus wird nach jeder Spülung das Spülwasser entfernt. In der Regel

wird mit dem suspendierten Kollagen in wässrigem Milieu zugegeben, beispielsweise in einer Suspension, dann besitzt diese vorzugsweise in etwa den gleichen pH-Wert, um pH-Verschiebungen durch die Wirkstoffzugabe zu vermeiden. Dadurch, daß zum Spülen bzw. Waschen entmineralisiertes Wasser verwendet wird und sich eine pH-Korrektur nach dem Spülen erwidrigt, läßt sich der Eintrag von Salzen in die Wirkstoffmatrix vermeiden, wodurch die Wirkstoffmatrix im wesentlichen salzfrei ist, was in vielen Fällen erwünscht ist.

Die Quellung kann während einer Zeit von 5 bis 60 Stunden, insbesondere zwischen 6 und 48 Stunden, vorgenommen werden. Die Quelldauer hängt von der Säurekonzentration und vom Ursprung des Kollagenmaterials ab. Die Konzentration der organischen Säure beim Quellvorgang beträgt normalerweise 0,01 bis 2 N, insbesondere 0,05 bis 0,5 N, wobei in der Regel mit 0,1 N gearbeitet wird. Eine geeignete organische Säure ist Essigsäure. Auch andere organische Säuren können verwendet werden, wobei solche mit biologischer Verträglichkeit bevorzugt sind. Flüchtige Säuren sind besonders bevorzugt, weil sie bei der Lyophilisation entfernt werden.

Durch die Quellung werden die Hautstücke, die, wie oben erwähnt, insbesondere bovinen Ursprungs sind, auf das 3 bis 10fache, insbesondere 4 bis 8fache, ihres Gewichtes aufgequollen. Dabei wird die Größe der vorgereinigten trockenen Hautstücke mit Vorteil so ausgewählt, daß sich nach der Quellung Stücke mit einem Durchmesser von ca. 1 cm ergeben. Diese Größe ist für die Handhabung und die anschließende Entfernung besonders geeignet. Im Anschluß an die Quellung und nach Entfernen des Waschwassers wird das gequollene Kollagengranulat in entmineralisiertem Wasser aufgenommen, um es für die anschließende Zerkleinerung vorzubereiten. Dabei wird die Wasermenge vorzugsweise so gewählt, daß sich eine 0,1 bis 10 %ige Mischung, bezogen auf das trockene Kollagenmaterial,

ergibt. Die Zerkleinerung erfolgt vorzugsweise in Dispergieren unter Rühren, wobei die Kollagenstruktur unter Erzeugung isolierter Kollagenfibrillen aufgebrochen wird. Nach Zugabe des mindestens einen schwerlöslichen Wirkstoffes und ggf. weiterer, weniger schwerlöslicher Wirkstoffe zur Suspension und erneuter Homogenisierung ist diese dann bereit für die anschließende Lyophilisation, ohne daß sie einer weiteren Zwischenbehandlung bedarf.

Die Erfindung wird näher erläutert anhand der nachfolgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen, die auch die näheren Zusammenhänge erkennen lassen sowie anhand eines Ausführungsbeispiels.

#### Quellschritt

Das nun vorliegende gereinigte Rinderhaut-Kollagen wird nun in einem ersten Aufarbeitungsschritt mit verdünnter Säure, vorzugsweise 0,1 N Essigsäure, über einen Zeitraum von 6 bis 48 Stunden, vorzugsweise 16 Stunden, gequollen. Durch die saure Quellung wird aus dem harten und spröden Rinderhaut-Kollagen ein elastisches Material, aus dem in einem späteren Schritt mit Hilfe eines mechanischen Vorganges (Schneidevorgang) die Kollagenfibrillen isoliert werden können.

Die Konzentration der Essigsäure während des Quellschrittes wird mit 0,1 N so gewählt, daß sich bei der in einem zweiten Schritt herzustellenden Kollagensuspension ein pH-Wert von 4,0 bis 4,5 einstellt. Liegt der pH-Wert der im zweiten Schritt herzustellenden Kollagensuspension oberhalb 4,8, fallen die Kollagenfasern aus der Suspension aus, und es liegt keine homogene Lösung mehr vor. Liegt der pH-Wert unter 3,5, ist die Kollagenmasse zähflüssig und nicht mehr verarbeitbar.

#### Spülschritt

Anhand von zwei Versuchsansätzen wird der Einfluß der Spülzyklen auf den pH-Wert bzw. die Essigsäurekonzentration im Spülwasser geprüft.

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgt potentiometrisch. Die Essigsäurekonzentration im jeweiligen Spülwasser wird enzymatisch ermittelt.

Es ergeben sich folgende Meßwerte:

Tabelle 1: pH-Wert und Essigsäurekonzentration bei den Spüllösungen

Lösung	pH-Wert Versuch 1	pH-Wert Versuch 2	Essigsäure- Konz. [mg/l] Versuch 1	Essigsäure- Konz. [mg/l] Versuch 2
Ansatz 0,1 N Essigsäure	2,85	2,82	6,37	6,40
16 h Quellung mit Kollagen	3,78	3,69	5,35	5,47
1. Spülung	3,90	3,94	0,36	0,33
2. Spülung	3,85	3,85	0,16	0,12
3. Spülung	3,88	3,95	0,12	0,07
4. Spülung	3,93	4,00	0,13	0,05
5. Spülung	3,98	4,05	0,08	0,05

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, reicht 5-maliges Spülen aus, um in der Spüllösung einen pH-Wert von annähernd 4,0 zu erhalten.

Wie bereits erwähnt, wurde die Konzentration der Essigsäure mit 0,1 N beim Quellvorgang so gewählt, daß sich bei der Herstellung der Kollagensuspension ein pH-Wert von 4,0 bis 4,5 einstellt. Während des Quellvorgangs hat sich das Gewicht des Kollagengranulates um den Faktor 4 bis 8 durch entsprechende Wasseraufnahme vergrößert. Es liegt nun als weiches, biegsames, elastisches Material der Größe 1 x 1 x 1 cm vor.

#### Mechanische Zerkleinerung

Zu dem gequollenen Kollagengranulat wird nun soviel Wasser zugesetzt, daß eine 0,1 bis 10 %ige Aufschlammung vorliegt. Diese Aufschlammung wird 2 bis 15 Minuten in einer Hochleistungsdispersionsmaschine mit 400 - 1200 U/min homogenisiert. Durch den mechanischen Aufbereitungsprozeß entsteht ein suspendiertes weitausgehendes Fasergeflecht, das mit der in vivo Anordnung von kollagenen Fasern im Corium keine Gemeinsamkeiten mehr aufweist. Die in vivo kräftigen, sich in allen Richtungen durchflechtenden Kollagenfasern sind aufgebrochen und in kürzere Bruchstücke zerfallen.

Es wurde nun gefunden, daß eine Änderung des pH-Wertes der Kollagensuspension durch Zugabe von 0,1 N Natronlauge bzw. 0,1 N Salzsäure zu folgenden Veränderungen in der Konsistenz der Suspension führt:

#### Eingestellter pH-Wert      Konsistenz der Kollagensuspension

3,07	Gel, breiartig
3,60	Gel, breiartig
4,03	gießfähige Suspension
4,30	gießfähige Suspension*
4,52	gießfähige Suspension
5,02	sehr dünnflüssig, Fibrillenaggregation
5,55	lange Kollagenfibrillen ausgefallen, Trennung von Fasern und Flüssigkeit

\* Hergestellte Suspension ohne Zugabe von Säure und Lauge

Folgende Beobachtungen wurden bei den verschiedenen pH-Werte-Einstellungen an der Kollagensuspension festgestellt:

- Unterhalb eines pH-Wertes von 3,6 wird die Kollagensuspension breiartig. Aber es findet kein Zusammenballen von Fasern zu Faserbündeln statt. Eine Trennung von Fasern und Flüssigkeit ist nicht festzustellen.
- Gibt man zu einer Kollagensuspension vom pH-Wert 3,6 die entsprechende Menge Natronlauge, um einen pH-Wert von 4,3 zu erzielen, so wird aus dem zähflüssigen Gel wieder eine dünnflüssige Suspension. Erhöht man den pH-Wert weiter (5,0), so findet eine Trennung von Fasern und Flüssigkeit statt. Die einzelnen Fasern aggregieren zu Faserbündeln.

Die Untersuchungen belegen, daß in dem bevorzugten pH-Bereich 3,8 bis 4,5 immer eine gießfähige Kollagensuspension vorliegt, die unproblematisch weiterverarbeitet werden kann.



### Homogenisierung

Zu der Kollagensuspension wird nun die entsprechende Menge der schwerlöslichen Arzneiform zugegeben.

Unter schwerlöslichen Arzneiformen sind insbesondere Wirkstoffe zu verstehen, die im physiologischen Milieu eine Löslichkeit von  $\leq 1$  mg/ml haben.

Nach Zugabe der schwerlöslichen Arzneiform wird die wirksstoffhaltige Suspension für 5 bis 30 Minuten unter Rühren mit einem elektrischen Rührwerk mit 20 bis 300 U/min homogenisiert. Die Einbringung der Wirkstoffe erfolgt als wässrige Aufschlämmung oder in Pulverform.

Die Lyophilisation pharmazeutischer Produkte wird seit vielen Jahren praktiziert und zwar in erster Linie mit dem Ziel, instabile Arzneiformen in trockene lagerfähige Formen zu überführen, aus denen sterile Arzneimittel herstellbar sind.

Der wesentlichste Schritt der Lyophilisation ist die Einfrierphase. In dieser Phase wird das Kristallgerüst geschaffen, aus dem die nachfolgende Sublimation erfolgt. Da es sich bei der Kollagensuspension um keine homogene Lösung, sondern um ein Mehrstoffsystem mit festen Bestandteilen handelt, wurden von den üblicherweise durchzuführenden Untersuchungen zur Ermittlung von Einfrierparametern, wie

- Bestimmung des eutektischen Punktes
- Bestimmung der Kollaps-Temperatur
- DSC-Messungen im Tieftemperaturbereich

Nur die eutektische Temperatur bestimmt. Untersuchungen von mehreren Kollagensuspensionen aus mehreren Kollagengranulaten ergab eine Gefrierpunkterniedrigung auf dem Bereich -2 bis -4 °C für eine Kollagensuspension mit 2 % Massenanteil

Kollagen. Die eutektische Temperatur für die Kombination aus Kollagensuspension und schwerlöslicher Arzneiform wird für jede Zusammenstellung vorzugsweise separat ermittelt. Die bei der Bestimmung des eutektischen Punktes erhaltenen Daten bilden die Grundlage der Steuerung der Lyophilisation. Voraussetzung für eine ordnungsgemäße Lyophilisation bei den wirksstoffhaltigen Kollagensuspensionen ist, daß die eutektische Temperatur deutlich unterschritten wird.

Änderungen des pH-Wertes der Kollagensuspension durch Zugabe von Natronlauge bzw. Salzsäure führt zu folgenden Veränderungen in der physikalischen Stabilität des lyophilisierten Vlieses bzw. der erforderlichen Zeit für die vollständige Benetzbarkeit.

Tabelle 3: Einfluß des pH-Wertes der Kollagensuspension auf die physikalische Stabilität der gefriergetrockneten Kollagenmatrix und die Zeit für vollständige Benetzung nach Eintauchen in Wasser

Eingestellter pH-Wert der Suspension	Zeit für vollständige Benetzbarkeit [s]	phys. Stabilität der lyophilisierten Matrix
2,98	30,2	gut
3,40	42,7	gut
3,87	27,6	gut
4,30	10,8	gut
4,45	12,6	gut
4,90	7,0	schlecht*
5,34	6,1	schlecht*

\* unter einer schlechten Stabilität ist zu verstehen, daß das gefriergetrocknete Vlies nach dem Einlegen in Wasser in einzelne Faseraggregate zerfällt.

Die Untersuchungen zeigen, daß man aus Kollagensuspensionen im pH-Bereich 3,8 bis 4,5 immer Kollagenvliese mit einer guten "Naßstabilität" erhält.

Weitere Schlußfolgerungen sind:

- pH-Werte < 3,8 zeigen eine langsamere Benetzbarkeit als Vliese mit pH-Werten > 3,8.
- Bei eingestellten pH-Werten > 4,5 nimmt die Stabilität der hergestellten Vliese stark ab.
- Die optimale pH-Wert-Einstellung für die Kollagensuspension liegt zwischen pH-Wert 3,8 bis 4,5.
- Liegt der pH-Wert der Kollagensuspension oberhalb 4,8, fallen die Kollagenfasern aus der Kollagensuspension aus und es ist keine homogene Lösung mehr vorhanden.

Die aus Rinderhaut gewonnene wirkstoffhaltige Kollagenmatrix läßt durch den mehrstufigen mechanischen und chemischen Aufarbeitungsprozeß ein weltmaschiges Fasergeflecht erkennen (Lichtmikroskopischer Befund), das mit der in vivo-Anordnung von Kollagenen Fasern im Corium keine Gemeinsamkeiten mehr aufweist. Die in vivo-kräftigen, sich in allen Richtungen durchflechtenden Kollagenfaserbündel sind aufgebrochen und in kürzere Bruchstücke zerfallen, so daß ein System mit weiten interfibrillären Spalträumen entsteht. Bei der Lyophilisation ist ein grobes Maschenwerk entstanden, das man räumlich betrachtet mit einem Naturschwamm vergleichen kann. Es wird eine gewaltige innere Oberflächenvergrößerung geschaffen, die von kollagenen Fasern gebildet wird.

Elektronenmikroskopische Schnittpräparate zeigen ein Muster aus Kollagenfibrillen zu unterschiedlich dicken Bündeln geordnet, die in alle Richtungen des Raumes verlaufen. Dementsprechend trifft man auf Längs-, Quer- und Tangentialanschnitte von Kollagenfibrillen. Längs getroffene Fibrillen besitzen

ihre typische Querstreifung. Besonders eindrucksvoll ist das durch die Rasterelektronenmikroskopie sichtbare Oberflächenrelief der lyophilisierten Kollagensuspensionen. Von kräftigen Faserbündeln zweigen nach beiden Seiten dünnere Fasern ab. Dort, wo mehrere dünne Fasern zusammentreffen, entstehen häufig knotenförmige Verdickungen. Daneben kommen mächtige Kollagenfibrillen vor, die seilartig verdreht sind.

Von zwei verschiedenen Kollagenimplantaten (Matrix mit Clindamycin-Palmitat sowie Matrix mit Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid) schneidet man jeweils 1 cm<sup>2</sup> große Stücke zu. Die Stücke werden gewogen und das Gewicht protokolliert. Anschließend werden die wirkstoffhaltigen Implantate in Reagenzgläser mit je 5 ml 0.066 M-Phosphatpuffer (pH = 7,4) bzw. Humanserum eingelegt und bei 37 °C im Wasserbad einkuiert. Nach 24 Stunden wird das Implantat entnommen und in frische Puffer-Lösung bzw. frisches Serum eingelegt. Die Gesamteinkuierszeit beträgt bei 24-stündigem Pufferwechsel 10 Tage. Als biologisches Maß für die Antibiotika-Konzentration dient die Hemmwirkung (Bestimmung des Hemmofurchmessers) auf die Testorganismen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 sowie *Micrococcus luteus* DSM 348. Dabei wird die Hemmwirkung der Probe mit der Hemmwirkung abgestufter Dosen eines Standards (hier Clindamycin-Hydrochlorid) verglichen. Von gleich großen Hemmhöfen bei Proben und Standards kann auf gleich große Antibiotika-Konzentration geschlossen werden.

Die Abgabe der Antibiotika aus den verschiedenen Implantaten kann der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Wirkstoffabgabe Clindamycin-Palmitat in Serum als Funktion der Elutionszeit

Tag	Clindamycin-Palmitat in Phosphor-Puffer [ $\mu\text{g}/\text{Implantat}$ ]	Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid in Phosphat-Puffer [ $\mu\text{g}/\text{Implantat}$ ]	Clindamycin-Palmitat in Serum [ $\mu\text{g}/\text{Implantat}$ ]
1	18,3	16,0	8,0
2	46,1	23,8	21,2
3	46,1	46,1	34,7
4	52,7	35,4	29,1
5	46,1	46,1	36,1
6	60,1	46,1	37,8
7	46,1	35,4	22,1
8	18,3	20,8	16,5
9	12,3	7,2	10,8
10	12,3	5,5	8,1

Aus der Tabelle kann man eindeutig erkennen, daß die Antibiotikaabgabe aus beiden Implantaten auch nach 10 Tagen noch nicht beendet ist. Die abgegebene Menge an Antibiotikum ist bei dem Hydrochlorid des Clindamycin-Palmitat-Esters und dem freien Palmitat-Ester annähernd gleich je Zeiteinheit.

Um zu überprüfen, ob Reste von Antibiotikum auf dem Trägermaterial verblieben sind, wurden die Implantate nach 10 Tagen Elutionszeit auf eine mit *Staphylococcus aureus* bzw. *Micrococcus luteus* kontaminierte Agaroberfläche gelegt und bei 37 °C bebrütet. Auch in den Kollagenschwämmen läßt sich nach dieser Zeit noch Antibiotikum nachweisen.

Besteht die Nachfrage nach Implantaten, die einen Wundbereich über einen Zeitraum von 5 bis 15 Tagen schützen sollen, sind die hier beschriebenen Materialien geeignet, diesen Schutz zu gewährleisten. Es liegt hier eine Kombination aus Matrix und Wirkstoff vor, die den Wirkstoff verzögert in geeigneten Kon-

zentrationen über einen Zeitraum von 5 bis 15 Tagen freigegeben. Zusätzlich ist die Matrix bis zur vollständigen Resorption durch anhaftendes Antibiotikum vor Keimbeseidlung geschützt. Bei der Untersuchung der Wirkstoffe Clindamycin-Palmitat und Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid wurde nun überraschend gefunden, daß entgegen der in der Literatur publizierten Ergebnisse (Antimicrobial Chemotherapy, herausgegeben von David Green Wood, 3. Auflage, Oxford University Press 1995) auch das mit Palmitinsäure veresterte Clindamycin antibiotische Aktivität zeigt. Bei der Elution im wässrigen Puffersystem konnte überraschenderweise antibiotische Wirksamkeit über einen Zeitraum von mindestens 11 Tagen nachgewiesen werden. Die Veresterung der OH-Gruppe von Clindamycin mit Palmitinsäure setzt zwar die Löslichkeit von Clindamycin drastisch herab (siehe Tabelle 5), führt aber nicht zu einer Inaktivierung des Moleküls bezüglich seiner antibiotischen Wirksamkeit. Das heißt, Clindamycin-Palmitat muß nicht erst enzymatisch durch Esterasen in das wirksame Molekül Clindamycin gespalten werden. Das ist bedeutsam, da dadurch der Einsatz einer Clindamycin-Palmitat-haltigen Kollagen-Matrix nicht an das Vorhandensein von Enzymen gekoppelt ist.

Tabelle 5: Unregelmäßiges Löslichkeitsverhalten der Palmitat-Ester von Lincomycin und Clindamycin\*

pH	Lincomycin-Palmitat-Hydrochlorid [mg/ml]	pH	Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid [mg/ml]
2,3	0,124	3,7	53,2
-	-	5,8	< 0,001
7,7	0,0249	7,4	< 0,0002

Literatur: E.L. Rowe, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 68, No. 10 (1979), Seiten 1292 - 1296.

Ausführungsbeispiel

## 1. Quellschritt

1823,1 g Kollagengranulat (Wassergehalt 15,0 % mittlere Granulatgröße 4 bis 6 mm) werden nach Quellung in 36 l 0,1 N Essigsäure über 16 Stunden 5 mal mit 5 l Wasser für Injektionszwecke gespült. Der pH-Wert der Spüllösung muß nach der fünften Spülung  $\geq 4,0$  sein. Andernfalls muß weitergespült werden.

## 2. Mechanische Zerkleinerung

Anschließend wird mit Wasser für Injektionszwecke auf ein Gesamtgewicht von 90,0 kg unter Berücksichtigung der später zuzugebenden Menge an schwerlöslicher Arzneiform aufgefüllt. Die oben angeführte Aufschlammung wird für 2 Minuten in einer Hochleistungs-Dispergiermaschine mit 680 U/min homogenisiert. Der pH-Wert der homogenisierten Masse wird überprüft.

## 3. Homogenisierung

Zu der Kollagensuspension werden nun 224,48 g Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid (entsprechend 136,26 g Clindamycin-Base), suspendiert in 5 l 0,1 N-Acetat-Puffer vom pH = 3,6 bis 3,8, zugegeben. Die wirkstoffhaltige Suspension wird erneut für 15 Minuten mit einem elektrischen Rührwerk mit 150 U/min homogenisiert. Die Gesamtmasse der wirkstoffhaltigen Suspension beträgt jetzt 90,0 kg.

## 4. Lyophilisation

Zur Bestimmung des Aufgiebgewichtes auf die Gefrier Trocknungsschalen (Größe 45,6 x 45,6 cm) wird die erforderliche Menge an wirkstoffhaltiger Kollagensuspension pro Vlies in

Relation  $\frac{\text{verfügbare Fläche je Gefrier Trocknungsschale}}{\text{gesetzt.}}$

Die Plattengröße der Kollagenvliese nach der Gefrier Trocknung beträgt 43,5 cm x 43,5 cm  $\sim 1892,15 \text{ cm}^2$ . Ein wirkstoffhaltiges Kollagenvlies der Größe 5 cx 8 cm = 40,0  $\text{cm}^2$  soll 35 mg Clindamycin und 400 mg wasserfreies Kollagen enthalten.

Clindamycin-Base/Schale =  $\frac{1892,25 \text{ cm}^2}{40 \text{ cm}^2} \times 0,035 \text{ g} = 1,6557 \text{ g}$

Es sind deshalb:  $\frac{1,6557 \text{ g}}{136,26 \text{ g}} \times 90000,0 \text{ g} = 1093,6 \text{ g Kollagensuspension}$

auf jede Gefrier Trocknungsschale aufzugießen.

Die gefüllten Gefrier Trocknungsschalen werden in die Gefrier Trocknungsanlage eingebracht. Folgende Vorgaben gelten für den Gefrier Trocknungsprozeß:

Beladen der Anlage:	+7 °C
Produkttemperatur beim Einfrieren:	+7 °C $\Rightarrow$ -45 °C
Kammerinnendruck beim Einfrieren:	10 <sup>3</sup> mbar
Produkttemperatur bei der Haupttrocknung:	-45 °C $\Rightarrow$ +38 °C
Kammerinnendruck bei der Haupttrocknung:	0,9 mbar
Produkttemperatur beim Nachtrocknen:	+38 °C $\Rightarrow$ +21 °C
Kammerinnendruck beim Nachtrocknen:	0,03 mbar

## 5. Sterilisation

Die Sterilisation erfolgt durch Strahlensterilisation mit 25 kGy oder Ethylenoxid.

PATENTANWÄLTE  
RUFF, BEIER UND PARTNER  
STUTTGART

Dipl.-Chem. Michael Ruff  
Dipl.-Ing. Joachim Beier  
Dipl.-Phys. Jürgen Schöndorf  
Dipl.-Chem. Dr. Thomas Mütschele  
European Patent Attorneys  
European Trade Mark Attorneys

Willy-Brandt-Straße 28  
D-70173 Stuttgart  
Telefon (0711) 22 29 76-0  
Telefax (0711) 22 29 76-76  
Country/Area Code: +49-711

Dresdner Bank (BLZ 600 800 00) Kto. 9 011 341  
Landesgerichtskasse (BLZ 600 501 01) Kto. 2 530 413  
Postbank Stuttgart (BLZ 600 100 70) Kto. 4 29 30-708  
VAT-Nr.: DE 147528073

Ruff, Beier und Partner · Willy-Brandt-Straße 28 · D-70173 Stuttgart

Anmelder: AESCULAP AG & CO. KG  
Am Aesculap-Platz  
D-78532 Tuttlingen

A 32 508

8. Dezember 1998 R/lg

Patentansprüche

1. Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren porösen Vlieses aus Kollagenfibrillen in lyophilisierter Form mit einer retardierten Freigabe von Wirkstoffen, enthaltend mindestens einen in Wasser und Körperflüssigkeiten schwerlöslichen Wirkstoff in homogener Verteilung.
2. Wirkstoffmatrix nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Schichtdicke von 0,5 mm bis 15 mm, insbesondere 2 mm bis 5 mm besitzt.
3. Wirkstoffmatrix nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Dichte von 12 mg/cm<sup>3</sup> bis 180 mg/cm<sup>3</sup> besitzt.
4. Wirkstoffmatrix nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Porenvolumen von 60 bis 80 % des gesamten Volumens besitzt.
5. Wirkstoffmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine mittlere Porengröße im Bereich von 20 µm bis 150 µm besitzt.

- 2 -

A 3

6. Wirkstoffmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Luftdurchlässigkeit von 2500 bis 5000 ml/cm<sup>2</sup>/min, insbesondere 2700 bis 3400 ml/cm<sup>2</sup>/min, bei einer Schichtdicke von 4,2 mm besitzt.
7. Wirkstoffmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine schwerlösliche Wirkstoff ein Arzneimittel, insbesondere ein Antibiotikum, ist.
8. Wirkstoffmatrix nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Antibiotikum Aminoglycosid-Antibiotika, insbesondere Clindamycin-Palmitat, Clindamycin-Palmitat-Hydrochlorid und/oder Gentamycin-Crocefat vorgesehen sind.
9. Wirkstoffmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich zu dem mindestens einen schwerlöslichen Wirkstoff mindestens einen weniger schwer- oder leichtlöslichen Wirkstoff enthält.
10. Wirkstoffmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie außer den Kollagenfibrillen als Trägerstruktur und dem mindestens einen Wirkstoff im wesentlichen frei von weiteren Bestandteilen ist.
11. Verfahren zur Herstellung einer biologisch abbaubaren Wirkstoffmatrix in Form eines offenporigen Vlieses oder Schwammes aus unvernetzten resorbierbaren Kollagenfibrillen, insbesondere zur Herstellung der Wirkstoffmatrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Stücke aus gereinigter, entfetteter und getrockneter Haut in verdünnten wässrigen Lösungen

organischer Säuren quellen läßt, bis ein elastisches Material entsteht, die gequollenen Stücke unter Vergrößerung des pH-Wertes mehrfach mit wässrigen Medien, insbesondere entmineralisiertem Wasser, spült, die gespülten Stücke zur Bildung einer Suspension von Kollagenfibrillen mechanisch zerfasert, die einen pH-Wert von  $> 3,5$  bis  $< 4,8$  aufweisende, gießfähige Kollagensuspension mit mindestens einem schwerlöslichen Wirkstoff in feilverteilter Form versetzt und homogenisiert und die wirkstoffhaltige Suspension anschließend zu dem Vlies bzw. Schwamm lyophilisiert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der für die Quellung verwendeten organischen Säure und die Anzahl der Spülungen so gewählt und aufeinander eingestellt werden, daß nach der Spülung und Zerkleinerung ohne vorherige pH-Korrektur eine Kollagensuspension mit einem pH-Wert  $> 3,5$  bis  $< 4,8$ , insbesondere von 4 bis 4,5, erhalten wird.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Spülung mindestens zwei, insbesondere mindestens fünf Spülzyklen, umfaßt.
14. Verfahren nach Anspruch 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Quellung während 5 bis 60 Stunden, insbesondere 6 bis 48 Stunden, durchgeführt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß zur Quellung eine Säurelösung mit einer Säurekonzentration von 0,01 bis 2 N, insbesondere 0,05 bis 0,5 N, verwendet wird.
16. Verfahren nach Anspruch 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Hautstücke in der organischen Säure auf das

3 bis 4fache, insbesondere 4 bis 8fache, ihres Gewichtes aufgequollen werden.

17. Verfahren nach Anspruch 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das gequollene Kollagengranulat nach dem Spülen und Entfernen des Spülwassers durch Wasserzusatz in eine 0,1 bis 10 %ige Mischung, bezogen auf das Gewicht des trockenen Kollagenmaterials, überführt wird und diese Mischung durch Dispergieren zu der Kollagensuspension homogenisiert wird, wobei der Faserverbund der Kollagenfibrillen aufgebrochen wird.
18. Verfahren nach Anspruch 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine schwerlösliche Wirkstoff in feilverteilter Form, insbesondere suspendiert in einem wässrigen Medium zugegeben wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Suspension der Kollagenfibrillen nach der Zugabe des mindestens einen schwerlöslichen Wirkstoffes zur gleichmäßigen Verteilung des mindestens einen Wirkstoffes in der Suspension homogenisiert wird.
20. Verfahren nach Anspruch 11 bis 19 dadurch gekennzeichnet, daß außer dem mindestens einen schwerlöslichen Wirkstoff mindestens ein weniger schwerlöslicher Wirkstoff, vorzugsweise gleicher Wirkungsrichtung, zugegeben wird.
21. Verfahren nach Anspruch 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die homogenisierte, wirkstoffhaltige Kollagensuspension ohne weitere Zwischenbehandlung zu insbesondere flächenhaften Vliesen oder Schwämmen lyophilisiert wird.

A 32 508

- 5 -

22. Verwendung der Wirkstoffmatrix nach einem der Ansprüche 1 bis 10 als implantierbares und vollständig resorbierbares Depot für Wirkstoffe mit einer retardierten Wirkstoffabgabe.

PATENTANWÄLTE  
RUFF, BEIER UND PARTNER  
STUTTGART

Dipl.-Chem. Dr. Michael Ruff  
Dipl.-Ing. Joachim Beier  
Dipl.-Phys. Jürgen Schöndorf  
Dipl.-Chem. Dr. Thomas Mütschelle  
European Patent Attorneys  
European Trade Mark Attorneys

Willy-Brandt-Straße 28  
D-70773 Stuttgart  
Telefon (0711) 222976-0  
Telefax (0711) 222976-76  
Country/Area Code: +49-711

Dresdner Bank (BLZ 600 600 000) Kto. 9011341  
Landesfiliale (BLZ 600 501 011) Kto. 2 530 413  
Postbank Stuttgart (BLZ 600 100 701) Kto. 429 30-708  
VAT-Nr.: DE 147528073

Ruff, Beier und Partner · Willy-Brandt-Straße 28 · D-70773 Stuttgart

Anmelder: AESCULAP AG & CO. KG  
Am Aesculap-Platz  
D-78532 Tuttlingen

A 32 508

8. Dezember 1998 R/19

Zusammenfassung

Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren porösen Vlieses, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft eine Wirkstoffmatrix in Form eines biologisch resorbierbaren porösen Vlieses aus Kollagenfibrillen in lyophilisierter Form mit einer retardierten Freigabe von Wirkstoffen. Die Matrix enthält mindestens einen in Wasser und Körperflüssigkeiten schwerlöslichen Wirkstoff in homogener Verteilung. Zu ihrer Herstellung wird einer in bestimmter Weise hergestellten Kollagensuspension ein schwerlöslicher Wirkstoff in feinverteilter Form zugesetzt.

- - - - -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)